

(19) 대한민국특허청 (KR)  
(12) 공개특허공보 (A)

(51) 。 Int. Cl. 7  
C12Q 1/68

(11) 공개번호 특2002 - 0069573  
(43) 공개일자 2002년09월05일

(21) 출원번호 10 - 2001 - 0009756  
(22) 출원일자 2001년02월26일

(71) 출원인 삼성에버랜드 주식회사  
서울 중구 을지로1가 50번지  
주식회사 코젠바이오텍  
서울 종로구 적선동 적선현대빌딩 510

(72) 발명자 남용석  
경기도안양시만안구안양동627 - 7213/6  
김중기  
경기도고양시덕양구화정동961은빛마을부영아파트1102동504호  
홍광원  
서울특별시강남구압구정동현대아파트71동1208호  
최선미  
충청북도영동군영동읍부용리615 - 7  
김수복  
서울특별시강동구천호4동299 - 13  
이선명  
경기도광명시철산1동제일아파트5동403호

(74) 대리인 유병선

참사경부 : 있음

(54) 다중 중합효소연쇄반응을 이용한 병원성 미생물의검출방법 및 검출키트

요약

본 발명은 다중 중합효소연쇄반응 (Multiplex - Polymerase Chain Reaction; M - PCR) 을 이용하여 식중독의 원인이 되는 6종의 병원성 미생물을 신속 정확하게 검출해 내는 병원성 미생물 검출방법 및 검출키트에 관한 것이다. 본 발명에서는 (a) 캄필로박터 제주니 (Campylobacter jejuni) 검출용 PCR 프라이머쌍 P1/P2 (서열목록 1,2); (b) 대장균 O157:H7 (E.coli O157:H7) 검출용 PCR 프라이머쌍 P3/P4 (서열목록 3,4); (c) 바실러스 세레우스 (Bacillus cereus) 검출용 PCR 프라이머쌍 P5/P6 (서열목록 5,6); (d) 단구증 리스테리아 (Listeria monocytogenes) 검출용 PCR 프라이머쌍 P7/P8 (서열목록 7,8); (e) 예르시니아 엔테로콜리티카 (Yersinia enterocolitica) 검출용 PCR 프라이머쌍 P9/P10 (서열목록 9,10); 그리고 (f) 살모넬라 속 미생물 (Salmonella sp.) 검출용 PCR 프라이머쌍 P11/P1

2 (서열목록 11,12)으로 이루어진 6쌍의 PCR 프라이머를 이용하여 다중 중합효소연쇄반응(M-PCR)으로 식중독의 원인이 되는 6종의 병원성 미생물을 동시에 탐지하는 검출방법 및 검출키트가 제공된다.

대표도

도 1

개요

병원성 미생물, 식중독, 대장균 O157:H7 (E.coli O157:H7), 중합효소연쇄반응, Multiplex-PCR, 프라이머, 검출키트

검출법

도면의 간단한 설명

도 1은 병원성 미생물을 혼합 배양한 후 추출한 게놈 DNA를 주형으로 하여 다중 중합효소연쇄반응(M-PCR)을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

도 2a~2f는 6종의 병원성 미생물을 각각 배양한 후 추출한 게놈 DNA를 주형으로 하여 중합효소연쇄반응을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 다중 중합효소연쇄반응(Multiplex-Polymerase Chain Reaction; M-PCR)을 이용하여 식중독의 원인이 되는 6종의 병원성 미생물을 신속 정확하게 검출해 내는 병원성 미생물 검출방법 및 검출키트에 관한 것이다.

과학기술의 발달에도 불구하고 식중독을 완전히 예방하는 것은 여전히 어려운 일이다. 식중독은 그 원인에 기초하여 자연독(복어독, 버섯독 등)에 의한 식중독; 음식물의 부패에 의한 식중독; 및 음식물 중 세균의 혼입 내지는 번식에 의한 식중독으로 크게 나눌 수 있다. 이들 식중독 중 자연독에 의한 식중독은 원인이 되는 음식물의 섭취를 피함으로써 쉽게 예방할 수 있고, 음식물의 부패는 음식물의 외관, 냄새 등의 변화에 의해 용이하게 검출되므로 음식물의 부패에 의한 식중독을 피하는 것도 비교적 용이하다. 그러나, 이에 비해 세균에 의한 식중독, 즉 세균성 식중독의 경우는 세균의 음식물에서의 혼입 내지는 번식이 일반적으로 육안으로 관찰되지 않고 전문적인 방법에 의하지 않고는 검출이 매우 곤란하기 때문에 가장 예방이 어려운 식중독이라고 할 수 있다.

최근 식당, 주문 배달업, 급식 센터, 패스트푸드점 등 대량으로 음식을 공급하는 시설과 이를 이용하는 소비자가 많아짐에 따라 이러한 시설에서 세균성 식중독이 발생할 경우 단시간내 많은 사람들이 식중독에 걸릴 위험이 있다. 그리고 세균성 식중독은 심한 구토, 설사, 복통, 고열 등과 같이 그 증상이 심각하기 때문에 집단 식중독의 발생은 식품공급업체와 소비자 모두에게 중대한 문제가 된다. 또한 이러한 식중독 원인균은 감염된 사람의 체내에서 내독소 등의 독성물질을 생성하기 때문에 감염후에 치료를 수행해야 하고, 치료가 어려운 경우도 많이 있으며, 특히 병원성 대장균 O157:H7 과 같이 출혈성 장염 등의 매우 심각한 증상을 나타내고 심한 경우 사망으로 이어지는 경우도 있다. 따라서, 이러한 병원성 식중독의 원인균을 조기에 발견하여 예방하는 것이 절실히 필요하다고 할 수 있다.

세균성 식중독의 원인균을 검출·확인하는 방법으로는, 채취한 검체를 선택배지를 이용하여 배양하고, 배지에 형성된 콜로니를 육안으로 관찰하거나, 기타 탐지확인 수단을 이용하여 확인하는 방법 등이 있으며, 최근에는 중합효소연쇄반응 (PCR)을 이용한 검사법이 개발·사용되고 있다.

중합효소연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction : PCR)은 아주 적은 양의 DNA만을 갖고서도 특정 부위의 DNA서열을 기하급수적으로 증폭할 수 있는 간단하고 편리한 방법으로, 증폭하고자 하는 DNA에 특이적으로 결합하는 서로 반대 방향의 두 종류의 프라이머와, 고온에서도 기능적으로 안정한 Taq DNA 중합효소 (polymerase)를 사용하여 서로 다른 세 가지 온도의 순환과정인 변성 (Denaturation step), 결합 (Annealing step), 연장 (Extension step)을 반복적으로 실행함으로써 특정 DNA를 증폭하게 된다. 중합효소연쇄반응 (PCR)을 이용한 병원성 미생물의 검출방법은, 검출하고자 하는 미생물의 특이 유전자를 인식하는 프라이머를 이용하여 PCR 반응으로 이를 증폭·확인하게 되는데, 검출효율이 높아 검체 중에 미량으로 존재하는 병원성 미생물도 검출할 수 있다.

PCR을 이용한 병원성 미생물 검출방법과 관련된 선행기술로는, 국내 특허공개 제1999-65107호와 국내 특허공개 제1999-88425호 등이 있다. 국내 특허공개 제1999-65107호는 중합효소연쇄반응법을 이용하여 병원성 대장균 (O157:H7)이 가지고 있는 특이 유전자 4종 (베로독신 2종, 장벽 부착 병원인자 및 효소 특이 유전자)을 검출할 수 있는 다중 유전자 동시 검출방법 (multiplex-PCR)을 기술하고 있으며; 국내 특허공개 제1999-88425호는 EHEC 또는 VTEC의 베로독소 유전자 또는 병원성 대장균 O157의 O 항원 합성영역 유전자와 선택적으로 혼성화하는 올리고뉴클레오티드를 제조하여 이 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 하여 유전자증폭을 함으로써 O157을 생산하는 균 및 베로독소를 생산할 수 있는 대장균을 선택적으로 검출하는 방법에 관해 기술하고 있다.

#### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명에서는 사람에게 식중독을 일으키는 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter jejuni*), 대장균 O157:H7 (*E.coli* O157:H7), 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*), 단구증 리스테리아 (*Listeria monocytogenes*), 예르시니아 엔테로콜리티카 (*Yersinia enterocolitica*), 및 살모넬라 속 (*Salmonella* sp.)의 6종의 병원성 미생물을 동시에 검출할 수 있는 방법 및 그 검출키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

또한, 본 발명에서는 식중독 균의 진단 시간을 종래의 4일~7일에서 하루로 단축할 수 있는 신속하고 정확한 검출방법 및 검출키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명에서는, (a) 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter jejuni*) 검출용 PCR 프라이머쌍 P1/P2 (서열목록 1,2); (b) 대장균 O157:H7 (*E.coli* O157:H7) 검출용 PCR 프라이머쌍 P3/P4 (서열목록 3,4); (c) 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*) 검출용 PCR 프라이머쌍 P5/P6 (서열목록 5,6); (d) 단구증 리스테리아 (*Listeria monocytogenes*) 검출용 PCR 프라이머쌍 P7/P8 (서열목록 7,8); (e) 예르시니아 엔테로콜리티카 (*Yersinia enterocolitica*) 검출용 PCR 프라이머쌍 P9/P10 (서열목록 9,10); 그리고 (f) 살모넬라 속 (*Salmonella* sp.) 미생물 검출용 PCR 프라이머쌍 P11/P12 (서열목록 11,12)로 이루어진 6쌍의 PCR 프라이머를 이용하여 다중 중합효소연쇄반응 (Multiplex - Polymerase Chain Reaction)으로 식중독의 원인이 되는 6종의 병원성 미생물을 동시에 탐지하는 검출방법 및 검출키트가 제공된다.

#### 발명의 구성 및 작용

이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.

본 발명에서는 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter jejuni*), 대장균 O157:H7 (*E.coli* O157:H7), 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*), 단구증 리스테리아 (*Listeria monocytogenes*), 예르시니아 엔테로콜리티카 (*Yersinia enterocolitica*) 및 살모넬라 속 미생물 (*Salmonella* sp.)의 6종의 병원성 미생물의 특이 유전자를 서로 크기가 다르게 동시에 탐지 할 수 있도록 6개의 PCR 프라이머쌍을 설계하고 합성한다.

첫 번째 PCR 프라이머쌍 P1/P2는 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter jejuni*)를 특이적으로 탐지 할 수 있도록 설계하였고, 증폭 산물의 크기는 127 bp이다. 본 PCR 프라이머의 염기서열은 다음과 같다.

PCR 프라이머 P1 : 5' - attttcgctgattttgattttagg - 3' (서열목록 1)

PCR 프라이머 P2 : 5' - tattgatatctttggtggaggcga - 3' (서열목록 2)

두 번째 PCR 프라이머쌍 P3/P4는 대장균 O157:H7 (*E.coli* O157:H7)을 특이적으로 탐지 할 수 있도록 설계하였고, 증폭 산물의 크기는 208 bp이다. 염기서열은 다음과 같다.

PCR 프라이머 P3 : 5' - gacagcagttataccactctgcaa - 3' (서열목록 3)

PCR 프라이머 P4 : 5' - gacgaaattctctctgtatctgcc - 3' (서열목록 4)

세 번째 PCR 프라이머쌍 P5/P6는 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*)를 특이적으로 탐지 할 수 있도록 설계하였고, 증폭 산물의 크기는 305 bp이다. 염기 서열은 다음과 같다.

PCR 프라이머 P5 : 5' - gactacattcacgattacgcagaa - 3' (서열목록 5)

PCR 프라이머 P6 : 5' - ctatgctgacgagctacatccata - 3' (서열목록 6)

네 번째 PCR 프라이머쌍 P7/P8은 단구증 리스테리아 (*Listeria monocytogenes*)를 특이적으로 탐지 할 수 있도록 설계하였고, 증폭 산물의 크기는 454 bp이다. 염기 서열은 다음과 같다.

PCR 프라이머 P7 : 5' - ctggcacaaaattacttacaacga - 3' (서열목록 7)

PCR 프라이머 P8 : 5' - aactactggagctgctgtttttc - 3' (서열목록 8)

다섯 번째 PCR 프라이머쌍 P9/P10은 예르시니아 엔테로콜리티카 (*Yersinia enterocolitica*)를 특이적으로 탐지 할 수 있도록 설계하였고, 증폭 산물의 크기는 551 bp이다.

PCR 프라이머 P9 : 5' - cctgtttatcaattgcgtctgtta - 3' (서열목록 9)

PCR 프라이머 P10 : 5' - ataaatgggggttcacttcactcag - 3' (서열목록 10)

여섯 번째 PCR 프라이머쌍 P11/P12는 살모넬라 속 미생물 (*Salmonella* sp.)을 특이적으로 탐지 할 수 있도록 설계하였고, 증폭산물의 크기는 678 bp이다.

PCR 프라이머 P11 : 5' - gaatcctcagtttttcaacgtttc - 3' (서열목록 11)

PCR 프라이머 P12 : 5' - tagccgtaacaaccaatacaaatg - 3' (서열목록 12)

본 발명에서는 상기 12가지(6쌍) 프라이머가 모두 혼입된 멀티플렉스 프라이머 혼합액 (Multiplex Primer Mixture)을 이용하여 다중 중합효소연쇄반응 (Multiplex - Polymerase Chain Reaction: M-PCR)으로 병원성 미생물을 검출한다.

검출방법은 먼저 병원성 미생물에 오염이 되었으리라고 의심되는 식품을 채취·배양하고, 배양된 미생물로부터 DNA를 열추출한 후, 이를 주형 DNA로 하여 상기 멀티플렉스 프라이머 혼합액을 이용한 다중 중합효소연쇄반응(M-PCR)을 수행한다. M-PCR 반응이 끝나면 증폭된 유전자 산물을 아가로스 겔상으로 전기 영동하여 특이 유전자 증폭 유무에 따라 식품에 어떠한 병원성 미생물이 오염 되었는지를 확인 판정한다.

도 1은 병원성 미생물을 혼합 배양한 후 추출한 게놈 DNA를 주형으로 하여 M-PCR를 수행한 결과를 나타낸 것이다. 도 1에서 레인 1(lane 1)은 사이즈 마커(size marker)이다. 레인 2는 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter jejuni*), 대장균 O157:H7 (*E.coli* O157:H7), 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*), 단구증 리스테리아 (*Listeria monocytogenes*), 예르시니아 엔테로콜리티카 (*Yersinia enterocolitica*) 및 살모넬라 속 미생물 (*Salmonella sp.*)의 6종의 병원성 미생물을 혼합하여 배양한 후, 여기에서 추출한 게놈(genomic) DNA를 주형으로 하여 멀티플렉스 PCR 프라이머로 중합효소연쇄반응을 수행한 결과이다. 레인 3은 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter jejuni*), 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*) 및 예르시니아 엔테로콜리티카 (*Yersinia enterocolitica*)의 3종의 병원성 미생물을 혼합하여 배양한 후 여기에서 추출한 게놈 DNA를 주형으로 하여 멀티플렉스 PCR 프라이머로 중합효소연쇄반응을 수행한 결과이다. 레인 4는 대장균 O157:H7 (*E.coli* O157:H7), 단구증 리스테리아 (*Listeria monocytogenes*) 및 살모넬라 속 미생물 (*Salmonella sp.*)의 3종의 병원성 미생물을 혼합하여 배양한 후 여기에서 추출한 게놈 DNA를 주형으로 하여 멀티플렉스 PCR 프라이머로 중합효소연쇄반응을 수행한 결과이다.

본 발명의 검출방법은, 상기 6쌍의 PCR 프라이머가 포함된 멀티플렉스 프라이머 혼합액을 이용하여 다중 중합효소연쇄반응(M-PCR)을 수행함으로써 상기 6종의 병원성 미생물을 한번에 신속 정확하게 검출할 수 있다.

또한, 본 발명에서는 PCR 프라이머로 상기 6쌍의 PCR 프라이머가 혼입된 멀티플렉스 프라이머 혼합액을 포함하는 병원성 미생물 검출키트가 제공된다. 검출키트는 상기 6쌍의 프라이머(서열목록 1~12)와 PCR을 이용한 미생물 검출키트의 일반적인 구성성분(반응완충액, Taq DNA 중합효소 등)을 포함한다. 본 발명의 바람직한 일 실시예에서 검출키트는 다음과 같이 구성된다.

(1) 서열목록 1~12의 상기 PCR 프라이머쌍 P1/P2; P3/P4; P5/P6; P7/P8; P9/P10 및 P11/P12을 포함하는 멀티플렉스 프라이머 혼합액

(2) 반응완충액(Reaction Buffer)

(3) Taq DNA 중합효소(Taq DNA polymerase)

이하, 실시예에 의해 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 다음의 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 실시예에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

#### 실시예 1

##### 6종의 병원성 미생물 탐지용 프라이머의 설계 및 합성

캄필로박터 제주니 (*Campylobacter jejuni*), 대장균 O157:H7 (*E.coli* O157:H7), 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*), 단구증 리스테리아 (*Listeria monocytogenes*), 예르시니아 엔테로콜리티카 (*Yersinia enterocolitica*) 및 살모넬라 속 (*Salmonella sp.*)의 6종의 병원성 미생물을 동시에 탐지할 수 있도록 녹는점을 유사하게 하여 다음의 표 1과 같이 병원성 미생물 검출용 PCR 프라이머를 설계, 합성하였다.

[표 1]

프라이머	검출 미생물	염기서열 (서열목록)
프라이머 1/2	Campylobacter jejuni	5' - attttcgctgattttgatttagg - 3' (서열목록 1)
		5' - tattgatctcttggaggagcga - 3' (서열목록 2)
프라이머 3/4	E.coli O157:H7	5' - gacagcagttataccactctgcaa - 3' (서열목록 3)
		5' - gacgaaattctctgtatctgcc - 3' (서열목록 4)
프라이머 5/6	Bacillus cereus	5' - gactacattcacgattacgcagaa - 3' (서열목록 5)
		5' - ctatgctgacgagctacatccata - 3' (서열목록 6)
프라이머 7/8	Listeria monocytogenes	5' - ctggcacaataattactacaacga - 3' (서열목록 7)
		5' - aactactggagctgctgttttc - 3' (서열목록 8)
프라이머 9/10	Yersinia enterocolitica	5' - cctgtttatcaattgcgtctgta - 3' (서열목록 9)
		5' - ataaatgggggttcacttcactcag - 3' (서열목록 10)
프라이머 11/12	Salmonella sp.	5' - gaatcctcagttttcaacgttc - 3' (서열목록 11)
		5' - tagccgtaacaaccaatacaaatg - 3' (서열목록 12)

## 실시예 2

## 병원성 미생물 검출키트의 구성

실시예 1에서 합성한 6쌍의 PCR 프라이머(서열목록 1 내지 12)를 포함하는 멀티플렉스 프라이머 혼합액을 만들어 다음의 표 2와 같이 검출키트를 구성하였다.

[표 2]

키트구성성분
5 × Reaction buffer
멀티플렉스 프라이머 혼합액 (서열목록 1~12)
Taq DNA 중합효소 (1U/μl)

## 실시예 3

## 다중 중합효소연쇄반응을 이용한 병원성 미생물의 탐지

병원성 미생물에 오염된 식품의 배양액으로부터 추출한 DNA를 주형으로 하여, 실시예 2에서 제조한 멀티플렉스 프라이머 혼합액으로 PCR 반응시켜 미생물의 특이 유전자를 증폭하였다. 증폭된 유전자 산물을 아가로스 겔상에서 전기영동한 후 특이 유전자의 증폭유무에 따라 병원성 미생물의 오염 여부를 판정하였다 (도 2a~2f 참조). 구체적인 실험방법은 다음과 같다.

## 1) 균체 열추출 시료의 조제

병원성 미생물에 오염이 되었으리라고 의심되는 식품 25g을 평량한 후, 이것을 225 ml의 증균 배양액에 첨가하여 37℃에서 18~24시간 진탕 배양하였다. 증균 배양액 1 ml를 1.5 ml 원심 분리용 튜브에 옮겨서 12,000 rpm의 속도로 5분간 원심분리한 후 상청액을 제거하고, 모아진 균체를 200 μl의 멸균 증류수에 현탁한 후 100℃에서 5분간 가열 처리하였다. 가열 처리 후 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 다음 상청액을 회수하여 이를 열 추출 시료로 하였다.

## 2) PCR 반응액 (전체 반응액 50 μl)

열 추출 시료 10 μl

5 × Reaction buffer 10 μl

멀티플렉스 프라이머 혼합액 5  $\mu$ l

Taq DNA 중합효소 (1U/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l

멸균 증류수 잔부 (전체 50  $\mu$ l)

### 3) PCR 조건

다중 중합효소연쇄반응은 초기 변성 (initial denaturation)을 94℃에서 2분간 수행 한 후, 변성 (denaturation, 94℃에서 30초), 결합 (annealing, 60℃에서 30초), 연장 (extension, 72℃에서 30초)을 총 40회 실시하였다.

### 4) 식품에 병원성 미생물 오염여부 판정

반응이 끝난 PCR 산물을 2% 아가로스 겔상에서 전기 영동으로 전개하여 균주 특이적 유전자 증폭 산물의 형성 유무로 병원성 미생물의 오염 여부를 확인하였다. 각각의 병원성 미생물에 오염된 식품의 검사결과를 도 2a~2f에 나타내었다.

도 2a는 검사식품이 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter jejuni*)에 오염된 경우로 127 bp의 유전자 증폭 산물이 확인되었으며, 도 2b는 식품이 대장균 O157:H7 (*E.coli* O157:H7)에 오염된 경우로 208 bp의 유전자 증폭 산물이 확인되었다. 도 2c는 식품에서 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*)가 검출된 경우, 도 2d는 식품에서 단구증 리스테리아 (*Listeria monocytogenes*)가 검출된 경우로 각각 305 bp, 454 bp의 유전자 증폭 산물이 확인되었다. 또한, 도 2e는 식품에서 예르시니아 엔테로콜리티카 (*Yersinia enterocolitica*)가 검출된 경우, 도 2f는 식품에서 살모넬라 속 (*Salmonella* sp.) 미생물이 검출된 경우로 각각 551 bp, 678 bp의 유전자 증폭 산물이 확인되었다.

## 발명의 효과

본 발명은 6쌍의 PCR 프라이머를 이용한 다중 중합효소연쇄반응(M-PCR)으로 한번에 식중독의 원인이 되는 주요 병원성 미생물 6종의 오염 여부를 판정할 수 있으므로 세균성 식중독의 예방에 효과적으로 활용될 수 있으며, 특히 종래에 통상 4일 내지 7일이 소요되던 식중독 균 진단 시간을 하루만에 진단 할 수 있도록 단축하여 시간과 경비를 현저하게 절감할 수 있는 장점을 가지고 있다.

### (57) 청구의 범위

#### 청구항 1.

중합효소연쇄반응(PCR)을 이용한 병원성 미생물의 검출방법에 있어서,

PCR 프라이머로 (a) 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter jejuni*) 검출용 PCR 프라이머쌍 P1/P2 (서열목록 1,2); (b) 대장균 O157:H7 (*E.coli* O157:H7) 검출용 PCR 프라이머쌍 P3/P4 (서열목록 3,4); (c) 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*) 검출용 PCR 프라이머쌍 P5/P6 (서열목록 5,6); (d) 단구증 리스테리아 (*Listeria monocytogenes*) 검출용 PCR 프라이머쌍 P7/P8 (서열목록 7,8); (e) 예르시니아 엔테로콜리티카 (*Yersinia enterocolitica*) 검출용 PCR 프라이머쌍 P9/P10 (서열목록 9,10); 그리고 (f) 살모넬라 속 미생물 (*Salmonella* sp.) 검출용 PCR 프라이머쌍 P11/P12 (서열목록 11,12)으로 이루어진 6쌍의 PCR 프라이머를 이용하여 다중 중합효소연쇄반응 (Multiplex - Polymerase Chain Reaction)으로 식중독의 원인이 되는 6종의 병원성 미생물을 동시에 탐지하는 것을 특징으로 하는 병원성 미생물의 검출방법.

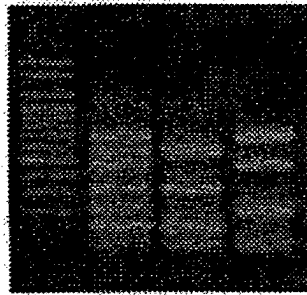
#### 청구항 2.

중합효소연쇄반응(PCR)을 이용하여 병원성 미생물을 검출하도록 PCR 프라이머, 반응완충액, Taq DNA 중합효소 등으로 구성된 병원성 미생물의 검출키트에 있어서,

상기 PCR 프라이머는 (a) 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter jejuni*) 검출용 PCR 프라이머쌍 P1/P2 (서열목록 1, 2); (b) 대장균 O157:H7 (*E.coli* O157:H7) 검출용 PCR 프라이머쌍 P3/P4 (서열목록 3,4); (c) 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*) 검출용 PCR 프라이머쌍 P5/P6 (서열목록 5,6); (d) 단구증 리스테리아 (*Listeria monocytogenes*) 검출용 PCR 프라이머쌍 P7/P8 (서열목록 7,8); (e) 예르시니아 엔테로콜리티카 (*Yersinia enterocolitica*) 검출용 PCR 프라이머쌍 P9/P10 (서열목록 9,10); 그리고 (f) 살모넬라 속 미생물 (*Salmonella* sp.) 검출용 PCR 프라이머쌍 P11/P12 (서열목록 11,12)의 6쌍의 PCR 프라이머를 포함하는 멀티플렉스 프라이머 혼합액인 것을 특징으로 하는 병원성 미생물 검출키트.

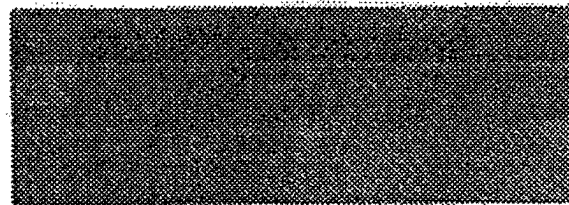
도면

도면 1  
1 2 3 4



도면 2a

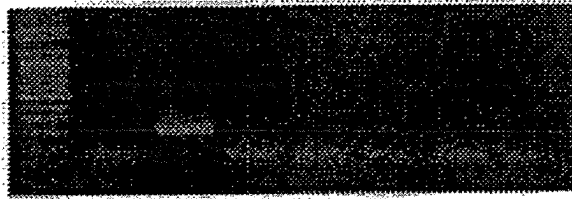
1 2 3 4 5 6 7 8





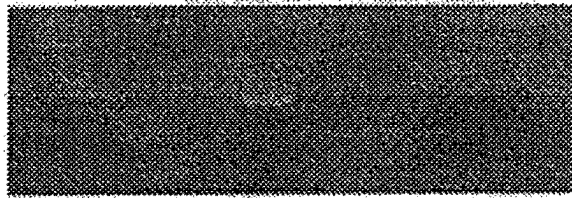
도면 2b

1 2 3 4 5 6 7 8



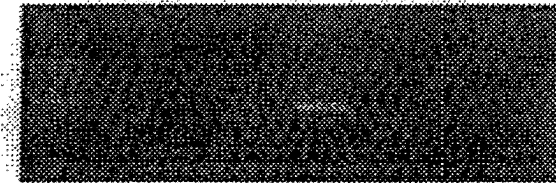
도면 2c

1 2 3 4 5 6 7 8



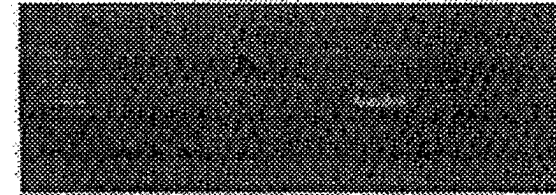
도면 2d

1 2 3 4 5 6 7 8

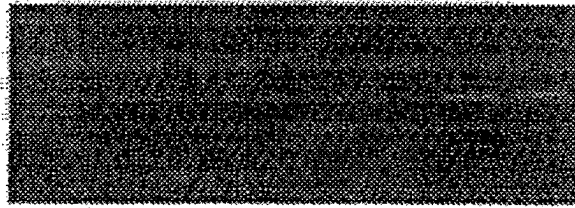


도면 2e

1 2 3 4 5 6 7 8



1 2 3 4 5 6 7 8



<110> KOGENEBIOTECH Co.,LTD.

<120> A method and test kit for detecting pathogenic microorganism by multiplex-PCR

<160> 12

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 1

atatttcgctg atttttgattt tagg

24

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 2

tattgatatc tttggtggag gcga

24

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 3

gacagcagtt ataccactct gcaa

24

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 4

gacgaaattc tctctgtatc tgcc	24
<210> 5	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> PCR primer	
<400> 5	
gactacattc acgattacgc agaa	24
<210> 6	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> PCR primer	
<400> 6	
ctatgctgac gagctacatc cata	24
<210> 7	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> PCR primer	
<400> 7	
ctggcacaaa attacttaca acga	24
<210> 8	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> PCR primer	
<400> 8	
aactactgga gctgcttggt ttcc	24
<210> 9	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> PCR primer	
<400> 9	
cctgtttatc aattgcgtct gtta	24
<210> 10	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> PCR primer	
<400> 10	
ataaatgggg ttcaattcac tcag	24
<210> 11	

<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> PCR primer  
<400> 11

gaatcctcag tttttcaacg tttc

24

<210> 12  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> PCR primer  
<400> 12

tagccgtaac aaccaataca aatg

24